FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1919 **THÈSE** N° 10

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

PAR

Madeleine POMMAY-MICHAUX
Interne provisoire des Hôpitaux de Paris,
Médecin Assistant du Service de Santé à l'Auto-Chir. 21.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ACTION PROTÉOLYTIQUE DE LA FLORE MICROBIENNE DANS LA PLAIE DE GUERRE

(TRAVAIL DES LABORATOIRES DE CHIMIE ET DE BACTÉRIOLOGIE DE L'AUTO-CHIR. 21).

Président : M. H. ROGER, *Professeur*.

PARIS
LIBRAIRIE LITTÉRAIRE ET MÉDICALE
2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 2

1919

Faculté de Médecine de Paris

LE DOYEN : M. ROGER — ASSESSEUR : M. POUCHET

PROFESSEURS MM.

Anatomie	NICOLAS
Anatomie topographique	N.
Physiologie	CH. RICHET
Physique médicale	WEISS
Chimie organique et Chimie générale	DESGREZ
Parasitologie et Histoire naturelle médicale	N.
Pathologie et Thérapeutique générales	ACHARD
Bactériologie	BEZANCON
Pathologie interne	VAQUEZ
Pathologie chirurgicale	N.
Anatomie pathologique	LETULLE
Histologie	PRENANT
Opérations et appareils	N.
Pharmacologie et matière médicale	POUCHET
Thérapeutique	CARNOT
Hygiène	CHANTEMESSE
Médecine légale	N.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	N.
Pathologie expérimentale et comparée	ROGER
Clinique médicale	WIDAL, GILBERT, CHAUFFARD, N.
Maladies des enfants	HUTINEL
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale	DUPRÉ
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JEANSELME
Clinique des maladies du système nerveux	PIERRE MARIE
Clinique chirurgicale	PIERRE DELBET, QUÉNU, LEJARS, HARTMANN
Clinique ophtalmologique	DE LAPERSONNE
Clinique des maladies des voies urinaires	LEGUEU
Clinique d'accouchements	BAR, COUVELAIRE, RIBEMONT-DESSAIGNES
Clinique gynécologique	N.
Clinique chirurgicale infantile	AUGUSTE BROCA
Clinique thérapeutique	ALBERT ROBIN
Hygiène et clinique de la 1re enfance	MARFAN.
Clinique des maladies infantiles	TEISSIER

Agrégés en exercice

MM.

ALGLAVE	GUILLAIN	LOEPER	ROUSSY
BERNARD	JEANNIN	MAILLARD	ROUVIERE
BRANCA	JOUSSET (A.)	MOCQUOT	SCHWARTZ (A
BRUMPT	LABBE (HENRI)	MULON	SICART
CAMUS	LAIGNEL-LAVASTINE	NICLOUX	TANON
CASTAIGNE	LANGLOIS	NOBECOURT	TERRIEN
CHAMPY	LECENE	OKINCZYC	TIFFENEAU
CHEVASSU	LEMIERRE	OMBREDANNE	VILLARET
DESMAREST	LENORMANT	RATHERY	ZIMMERN
GOUGEROT	LEQUEUX	RETTERER	
GREGOIRE	LEREBOULLET	RIBIERRE	
GUENIOT	LERI	RICHAUD	

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'École a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

M. LE PROFESSEUR H. ROGER

Doyen de la Faculté de Médecine de Paris.

A MON MAITRE

M. LE DOCTEUR CH. TALAMON

Médecin honoraire de l'Hôpital Bichat.
Chevalier de la Légion d'Honneur.

A MON MAITRE

M. LE PROFESSEUR PIERRE DUVAL

Chirurgien de l'Hôpital Lariboisière.
Médecin-Chef de l'A.-C. A. 21.
Officier de la Légion d'Honneur.

A MES MAITRES DANS LES HOPITAUX

Externat.

MM. le Pr HARTMANN, 1910-1911.
le Pr agrégé LECÈNE, 1910-1911.
le Pr ROGER, 1911-1912.
le Dr PARMENTIER, 1912-1913.

Internat provisoire.

MM. le Dr WEILL-HALLÉ, 1913-1914.
le Dr TALAMON, 1914-1919.
le Dr GUILLEMOT, 1919.

A MES AUTRES MAITRES DANS LES HOPITAUX

M. le Pr QUÉNU, M. le Pr agrégé OKYNCZIC.
MM. les Drs AVIRAGNET, DARIER, P.-E. WEILL, MERKLEN, Ch. FOIX, DOUAY, CADENAT, CHEVALLIER.

AVANT-PROPOS

Nous avons eu la bonne fortune d'être admise, dans les derniers mois de la guerre, à travailler à l'Ambulance chirurgicale automobile 21 dont le médecin-chef était M. le Professeur Pierre Duval.

A titre entièrement bénévole tout d'abord, puis comme médecin assistant du Service de Santé militaire, nous avons pu faire de nombreuses recherches bactériologiques et chimiques dans le laboratoire de notre formation. Avec sa courtoisie et son amabilité habituelles, notre maître, M. Pierre Duval a bien voulu non seulement nous accueillir, mais encore nous guider de ses précieux conseils et s'intéresser à nos travaux. Nous sommes heureuse de lui adresser ici nos très vifs remerciements et de le prier de croire à notre grande reconnaissance.

Le Chef de laboratoire de bactériologie, notre collègue le Docteur Vaucher, a mis à notre service sa grande compétence et tout son dévouement pour nous initier aux difficultés théoriques et techniques de l'étude des anaérobies. Les travaux spéciaux qu'il dirigeait sur la gangrène gazeuse nous ont fait profiter de son expérience et du matériel remarquable de son installation.

Qu'il veuille bien trouver ici l'assurance de notre gratitude amicale.

MM. Grigaut et Guérin ont bien voulu entreprendre avec nous les recherches qui font l'objet de ce travail. L'idée en revient d'ailleurs toute entière à M. Grigaut, et M. Guérin nous a considérablement aidée de ses connaissances techniques et de son concours si dévoué. C'est dans leur laboratoire de chimie, que M. Guérin a fait le travail énorme de dosages qui est à la base de cette thèse. Nous les prions tous deux d'agréer le témoignage de nos bien sincères remerciements.

Qu'il nous soit enfin permis d'exprimer à nos deux Maîtres, M. le Professeur Roger, et M. le Docteur Talamon l'hommage de notre respectueuse affection. Tous deux nous ont sans cesse guidée dans le courant de nos études. Leurs conseils nous ont bien souvent aidée à supporter les mauvais jours de la vie d'étudiante, et c'est un devoir bien agréable que nous remplissons en leur apportant ici le témoignage de notre grande admiration, et en leur dédiant ces pages.

TRAVAIL DES LABORATOIRES DE CHIMIE ET DE BACTÉRIOLOGIE DE L'AUTO-CHIRURGICALE 21

CHAPITRE I

L'étude de la protéolyse dans les plaies de guerre a été l'objet de recherches très nombreuses et très complètes en ce qui concerne l'action des diastases protéolytiques sur les tissus.

On sait depuis longtemps en effet que les tissus condamnés se liquéfient, puis s'éliminent sous l'action de véritables ferments spéciaux qui, s'attaquant aux matières protéiques, portent le nom de protéases.

On a beaucoup moins de données sur l'origine de ces ferments protéolytiques; actuellement, on s'accorde à reconnaître que les tissus contiennent en eux-mêmes certaines de ces diastases (autolyse par endoprotéases); on sait d'autre part le rôle des leucocytes polynucléaires neutrophiles dans la production des protéases.

Il est enfin établi que certains microbes sécrètent eux-mêmes des diastases protéolytiques.

L'étude de ces ferments d'origine microbienne, et tout particulièrement de la formation des acides aminés sous

l'influence de quelques microbes, a été faite par différents auteurs : Herbert-Henry, Berthelot, Pierre Delbet et Fiessinger, se sont attachés à ces recherches qualitatives, pratiquées sur des cultures, sur la gélatine, l'ovalbumine et autres milieux protéiques.

Par la suite, dans une série de travaux publiés en Angleterre, en collaboration avec J. E. G. Harris et avec S. V. Telfer, Ch. G. Lewis Wolf a étudié pour le Bacillus perfringens, le Bacillus sporogenes et le Bacillus histolyticus le développement de gaz, d'ammoniaque, d'acides aminés et d'acides volatils dans divers milieux de culture. Ces auteurs ont publié les dosages de ces différents corps par les procédés en usage.

Au même moment, Vaucher et Guérin publient à la Société de Biologie une étude qualitative de l'action protéolytique du Bacillus Sporogenes sur les milieux au blanc d'œuf et à la viande.

Nous avons jugé intéressant d'appliquer à ces recherches la technique de dosage de l'Azote non protéique par la nesslérisation, exposée par Grigaut et Guérin le 7 Décembre 1918, à la Société de Biologie.

Grâce au concours précieux de ces deux auteurs, nous avons pu doser, dans des tubes de culture de composition chimique déterminée, l'Azote non protéique développé au bout de temps variables d'ensemencement microbien. Nous avons étudié à ce point de vue la plupart des microbes principaux de la plaie de guerre, et deux de leurs associations les plus fréquentes.

Certes, notre travail ne présente qu'un intérêt documentaire pour le biologiste ; nous n'avons pu, pour

chaque espèce microbienne, faire l'étude d'un nombre suffisant de souches pour pouvoir considérer nos résultats comme absolument établis. Mais nous croyons intéressant de publier, tels qu'ils sont, les chiffres que nous avons obtenus.

CHAPITRE II

Technique bactériologique.

Le milieu.

Nous avons employé un milieu spécial bien connu des bactériologistes, qui est le milieu dit « au blanc d'œuf ». C'est d'ailleurs sur lui que Vaucher et Guérin ont pratiqué leurs premières recherches qualitatives déjà signalées.

Pour le préparer, on prend quatre œufs dont on sépare soigneusement les jaunes. On bat les blancs dans six cent soixante centimètres cubes d'eau à laquelle on ajoute huit centimètres cubes de la solution normale de soude. On fait chauffer lentement le mélange, et, quand il a atteint 95° centigrades, on le maintient à cette température pendant une heure et demie environ. On complète ensuite à un litre et on filtre la liqueur; on obtient ainsi un filtrat légèrement citrin, opalescent, qu'il suffit alors de répartir en tubes de six centimètres cubes. Ces tubes sont enfin stérilisés à l'autoclave à 120°.

C'est dans ce milieu que nous avons ensemencé les souches dont nous voulions étudier le pouvoir protéolytique.

Les espèces étudiées.

Nous devons à l'obligeance de MM. Weinberg et Séguin des souches pures de Bacillus fallax, bifermentans, histolyticus et putrificus.

D'autre part, nous avons isolé au Laboratoire de bactériologie des souches de B. œdematiens, perfringens, sporogenes; de vibrion septique; de B. Proteus et anthracoïdes et de staphylocoque doré.

La dislocation de notre laboratoire après l'armistice nous a empêchée de continuer les essais que nous avions projetés à propos du streptocoque et du colibacille; les premiers résultats que nous avions obtenus ne nous semblent pas suffisamment sûrs pour que nous les rapportions ici; les souches que nous avions à ce moment à notre disposition ne nous paraissent pas en effet à l'abri de toute critique.

Outre les études de la protéolyse de ces différents microbes, il nous a semblé intéressant de procéder à des recherches sur les propriétés protéolytiques de quelques associations microbiennes; nous rapportons ici les résultats obtenus avec sporogenes + perfringens et avec proteus + staphylocoque.

Enfin, les albumines de l'œuf étant mal désintégrées par certains des microbes étudiés, nous avons essayé de reprendre nos expériences en ensemençant ces sou-

ches sur du plasma sanguin de cheval. Malheureusement, la difficulté réside alors dans le peu de sécurité que présente la stérilité d'un tel milieu, et nous ne pouvons donner ici que des résultats obtenus avec le vibrion septique, qui, seul, paraît y avoir poussé à l'état pur.

Méthode d'ensemencement.

La méthode que nous avons employée ne diffère en rien de la technique habituelle des ensemencements en milieux liquides des Bac. anaérobies.

Nous ensemencions avec chaque espèce étudiée dix tubes de milieu au blanc d'œuf. Ces dix tubes étaient scellés à la lampe après qu'on y avait fait le vide et mis à l'étuve à 37 degrés, en même temps que plusieurs tubes témoins. Il est bien entendu que pour les microbes aérobies, nous agissions de même, mais sans fermer les tubes de culture.

Cette méthode permettait ainsi l'étude de la protéolyse au jour le jour, et à des temps variables de développement de la culture.

Cependant nous avons rencontré une difficulté digne d'être signalée, et qui explique quelques échecs : beaucoup d'anaérobies doivent en effet être ensemencés très richement pour pouvoir se développer dans des conditions normales.

Or il nous était impossible, pour ne pas modifier sensiblement la composition chimique du milieu, de pratiquer ces ensemencements riches qui auraient introduit dans nos tubes un demi-centimètre cube au

moins de milieux organiques à l'œuf ou à la viande. Nous avons dû au contraire nous appliquer à repiquer chacun de nos tubes avec une seule goutte de la culture mère. Dans ces conditions, tous nos tubes n'ont pas toujours poussé au cours de nos essais ; il nous est arrivé ainsi d'avoir brusquement un dosage sans aucune protéolyse alors que les tubes dosés les jours précédents et suivants étaient le siège d'une désintégration intense.

Pour éviter ces erreurs de dosage dus au mauvais développement toujours possible de nos espèces microbiennes, nous avons cru nécessaire de toujours vérifier nos tubes de culture, tant au point de vue de leur richesse que de leur virulence, et ce n'est qu'après nous être assurés de ces résultats que nous pratiquions la série de nos dosages.

Pour certaines espèces dont l'action protéolytique semble être lente, nous croyons enfin qu'il aurait fallu peut-être faire porter les expériences sur un temps de colonisation beaucoup plus considérable et sur un bien plus grand nombre de tubes.

CHAPITRE III

Technique du dosage.

Pour faire le dosage de l'azote non protéique de nos tubes de culture, nous avons employé la méthode décrite par A. Grigaut et F. Guérin à la Société de Biologie le 7 Décembre 1918, sous le titre de : *Dosage colorimétrique de l'azote non protéique du sang par le réactif de Nessler.*

Ces auteurs, après avoir montré la difficulté qu'il y a à doser l'azote non protéique par la méthode de Kjeldahl qui nécessite une quantité assez grande de matériel, (le sang en la circonstance) ont pu, grâce aux perfectionnements que Folin et Denis ont apportés à la nesslérisation, faire des dosages d'azote non protéique sur des quantités réduites de matériel tel que 2 à 5 centimètres cubes; ils ont pu cependant établir que le dosage gardait toute sa valeur.

Le principe de ce dosage repose sur les opérations suivantes :

1° Séparation des albumines.

2° Hydrolyse et transformation en ammoniaque de la totalité des substances azotées comprises dans le liquide désalbuminé.

3° Dosage de l'ammoniaque ainsi formé par le procédé de la nesslérisation.

Les auteurs se sont efforcés de respecter les conditions indiquées par Folin et Denis afin de pouvoir pratiquer directement la nesslérisation sur la solution hydrolisée; la distillation ou l'entrainement à l'air préalables sont supprimés, car ces opérations sont toujours très laborieuses.

Pour séparer les albumines, on emploie l'acide trichloracétique à 20 p. 100 suivant la technique de Moog; cet acide a des avantages précieux; c'est un excellent précipitant des albuminoïdes, et il disparaît complètement pendant l'hydrolyse.

L'hydrolyse est assurée par le procédé de Kjeldahl modifié par Folin, et l'ammoniaque ainsi formé est dosé par le procédé de nesslérisation directe de Folin et Denis.

Dans le cas particulier de la protéolyse microbienne que nous avons étudiée, il est nécessaire pour que la méthode conserve toute sa valeur, que la *quantité d'azote prélevée pour l'hydrolyse totale ou la nesslérisation soit inférieure à un milligramme.*

Ces diverses opérations nécessitent un certain nombre de solutions et de réactifs dont nous donnons ci-dessous le détail.

Solutions et réactifs nécessaires.

1° Une solution de soude à 10 p. 100 qui ne contienne ni carbonates, ni sulfates.

Pour la préparer, faire dissoudre environ 500 grammes de soude en plaques dans 800 centimètres cubes d'eau distillée. Laisser reposer dans un flacon bouché pendant plusieurs jours *jusqu'à l'éclaircissement complet* par sédimentation. Décanter le liquide *parfaitement* limpide qui surnage; ce liquide est titré en présence de phénolphtaléine, il est dilué avec de l'eau distillée afin d'obtenir une solution qui contient 10 p. 100 de soude.

2° Un réactif de Nessler contenant 5 à 6 p. 100 de HgI^2, 2 KI et 3 p. 100 de soude.

Pour le préparer, faire dissoudre 75 grammes d'iodure de potassium dans 50 centimètres cubes d'eau chaude, y ajouter 100 grammes de bi-iodure de mercure et mélanger le tout. Diluer la solution obtenue à 500 centimètres cubes d'eau distillée, filtrer et compléter à un litre.

Prendre ensuite 300 centimètres cubes de la solution précédente, y ajouter 300 centimètres cubes de la solution de NaOH à 10 p. 100 (exempte de carbonates) diluer à un litre avec de l'eau distillée et mélanger.

3° Une mixture phospho-sulfurique préparée en mélangeant 1 volume d'acide sulfurique pur à 66° Baumé, soit 100 centimètres cubes, et 3 volumes d'acide phosphorique pur à 60°, soit 300 centimètres cubes ; on ajoute à ce mélange 1/15e de solution de sulfate de cuivre à 10 p. 100, soit 25 centimètres cubes.

Laisser reposer 24 heures et filtrer sur coton de verre.

4° Une solution exactement titrée de sulfate d'ammo-

niaque correspondant à 0 milligr. 01 d'azote par centimètre cube.

Pour la préparer, faire dissoudre 4 gr. 716 de sulfate d'ammoniaque pur et desséché dans un litre de solution de $SO^4H^2N/5$ (afin d'empêcher le développement de moisissures), prélever 10 centimètres cubes de la solution précédente et les étendre à un litre pour obtenir la solution étalon type qui servira aux dosages.

5° Une solution aqueuse d'acide trichloracétique à 20 p. 100 (formule de Moog).

Technique. — On prend 3 à 5 centimètres cubes du milieu à doser, on ajoute un volume égal d'acide trichloracétique à 20 p. 100, on mélange et on filtre après quelques minutes de contact.

Dans un large tube à essai de 190 millimètres × 13 à 15 millimètres, on place :

2 centimètres cubes de filtrat trichloracétique (quantité qui correspond à 1 centimètre cube de milieu); 1 centimètre cube de mixture phospho-sulfurique, et 1 fragment de pierre ponce.

On fixe le tube à essai à un support vertical et on chauffe à température constante la partie inférieure du tube.

Quand l'eau est éliminée et que l'on voit les vapeurs blanches apparaître, on couvre l'ouverture du tube. On peut employer pour cet usage le fond d'un autre tube à essai coupé à un centimètre de son extrémité, que l'on place, en maintenant la concavité en haut; on règle alors la flamme de manière à ce que les vapeurs blan-

ches emplissent le tube sans s'échapper à l'extérieur.

Le mélange charbonne, puis se décolore, prenant l'aspect d'un liquide légèrement bleuâtre (cette coloration est due à la présence du cuivre). Au fond du tube, on voit se former un dépôt blanc de silice dû à l'attaque du verre par l'acide phosphorique. L'hydrolyse est terminée et l'opération totale n'a pas duré plus de cinq minutes. *Il est nécessaire que le temps de chauffage compté à partir du moment où le tube a été couvert, ne soit pas inférieur à deux minutes.*

On enlève ensuite le tube de la flamme, on laisse refroidir deux minutes et on ajoute de l'eau distillée. On transvase dans un flacon jaugé de 100 centimètres cubes en entraînant les particules de silice. On rince à plusieurs reprises avec de l'eau distillée que l'on met dans le ballon jaugé jusqu'à concurrence de 70 à 75 centimètres cubes.

On ajoute à la liqueur ainsi obtenue de la soude en quantité nécessaire pour obtenir une alcalinisation convenable, soit environ 13 cm^3 5 de soude à 10 p. 100.

Cette quantité répond aux 11/8e de la dose de NaOH à 10 p. 100 nécessaire pour neutraliser en présence de phénolphtaléine le mélange hydrolysé et augmenté de 1 centimètre cube.

Dans la fraction 11/8e, on compte l'acide sulfurique et l'acide phosphorique comme ayant la même activité vis-à-vis de la phénolphtaléine. Ceci n'est pas rigoureusement exact car 29 centimètres cubes d'acide sulfurique concentré titrent autant que 33 centimètres cubes d'acide phosphorique concentré.

L'acide sulfurique et l'acide phosphorique figurent ainsi sensiblement le premier pour le quart et le second pour 3/4 dans l'acidité de la mixture phospho-sulfurique. Comme en présence de la phénolphtaléine la soude ne sature que les 2/3 de l'acidité phosphorique, il faut ajouter au titrage trouvé la moitié du titrage propre à l'acide phosphorique, soit la moitié des 3/4, soit les 3/8^{e} pour avoir la neutralisation chimique de la liqueur. C'est pour cette raison que l'on prend les 11/8^{e} de la quantité de soude déterminée en présence de la phénolphtaléine. Le centimètre cube qu'on ajoute en supplément est destiné à fournir l'alcalinisation convenable pour la nesslérisation.

En même temps que les opérations précédentes, on prépare l'étalon colorimétrique. On place dans un vase jaugé de 100 centimètres cubes, 0 cm^{3} 8 de mixture phospho-sulfurique et 25 centimètres cubes (dans les cas normaux) de la solution étalon type de sulfate d'ammoniaque. On ramène le liquide à 70-75 centimètres cubes et on alcalinise par 13 centimètres cubes de NaOH à 10 p. 100.

Les deux solutions alcalinisées sont *mélangées exactement* ; on ajoute alors dans chacune d'elles 10 centimètres cubes de réactif de Nessler (formule précédente) ; on complète à 100 centimètres cubes avec de l'eau distillée et on mélange.

Il ne reste plus qu'à comparer les teintes après avoir séparé par centrifugation la silice dans une portion de la liqueur à doser. Cette comparaison se fait au moyen du colorimètre de Duboscq.

Pendant l'hydrolyse, l'acide trichloracétique est complète-

ment détruit et éliminé. Il ne reste que l'acidité due à la mixture phospho-sulfurique qui elle-même est réduite de 1/5e environ. C'est pourquoi nous prenons pour l'étalon 0 cc. 8, de manière à réaliser exactement les mêmes conditions d'alcalinité dans les deux milieux. L'erreur encourue est d'ailleurs minime si on ne tient pas compte de ce fait.

La technique que nous venons de décrire ne nécessite aucune attention particulière. Elle fournit des résultats d'une précision remarquable, absolument comparables à ceux obtenus par la méthode de Kjeldahl.

Les auteurs indiquent en dernier que ce procédé ne se limite pas au simple dosage de l'Azote non protéique du sang ; il s'agit là d'une méthode générale qui convient à l'évaluation de l'azote sous ses différents états : azote protéique, azote des protéoses, azote de l'urée et azote de l'ammoniaque.

C'est d'ailleurs grâce à cette méthode que nous avons pu faire les différents dosages qui sont à la base de ce travail.

CHAPITRE IV

Mesure de la Protéolyse microbienne.

Pour apprécier la protéolyse microbienne, nous avons fait une série de dosages en employant la technique de la nesslérisation directe que nous avons décrite dans le chapitre précédent ; nous avons d'ailleurs apporté les résultats que nous avons obtenus avec A. Grigaut et Fr. Guérin, à la séance de la Société de Biologie du 25 Janvier 1919.

Nous insistons encore sur la nécessité qui existe à prélever une quantité d'azote inférieure à un milligramme pour l'hydrolyse totale ou la nesslérisation afin que la technique indiquée soit valable dans tous les cas.

Nous avons étudié l'action protéolytique de différents microbes ensemencés dans le milieu à l'œuf en *pratiquant en série* les dosages suivants.

1° ***Dosage de l'Azote total.*** — Le milieu de culture est dilué au 1/10^{e} ; on prélève 2 centimètres cubes de cette dilution, qui correspondent à 1/5^{e} de centimètre cube du milieu ; on y ajoute 1 centimètre cube de mixture phospho-sulfurique et un fragment de pierre ponce, et

on pratique l'hydrolyse et la nesslérisation selon la technique décrite dans le chapitre précédent pour l'azote non protéique du sang.

2° *Dosage de la somme azote des protéoses + azote non protéique*. — Dans une éprouvette jaugée de 8 centimètres cubes, mettre 2 centimètres cubes du milieu de culture, mesurés exactement à l'aide d'une pipette graduée ; y ajouter 4 centimètres cubes de solution de NaCl à 20 p. 100. Mélanger le tout, acidifier nettement avec quelques gouttes d'acide acétique au 1/10e et compléter à 8 centimètres cubes avec de l'eau distillée. Mélanger à nouveau, transvaser dans un large tube à essai et porter progressivement à l'ébullition en agitant constamment et en évitant le départ de vapeur d'eau, la partie supérieure du tube qui sert de condensateur doit rester froide ; on jette le mélange coagulé sur un filtre et on poursuit la filtration jusqu'à l'obtention d'un liquide limpide.

On prend 2 centimètres cubes de filtrat refroidi, qui correspondent à 1/2 centimètre cube du milieu, on y ajoute 1 centimètre cube de mixture phospho-sulfurique et on traite cette solution pour l'hydrolyse totale et la nesslérisation en suivant la technique indiquée pour l'azote non protéique du sang.

Dosage de l'azote non protéique. — Nous avons suivi la même technique que celle indiquée au chapitre précédent sous le titre de dosage colorimétrique de l'azote non protéique du sang par le réactif de Nessler.

(*Comptes rendus de la Société de Biologie*. A. Grigaut et Fr. Guérin, 7 Décembre 1918, page 1139).

Dosage de l'Ammoniaque. — On prend quelques centimètres du milieu de culture auxquels on ajoute le même volume d'acide trichloracétique à 20 p. 100, on mélange et on filtre après quelques minutes de contact.

On procède ensuite exactement comme dans le cas prévu pour l'urée du sang. (A. Grigaut et Fr. Guérin. Procédés précis de dosage de l'urée dans de faibles quantités de sang. (*Comptes rendus de la Société de Biologie*, 11 Janvier 1919, page 25).

« Dans un flacon jaugé de 50 centimètres cubes, on place 1 à 6 centimètres cubes de filtrat trichloracétique (qui correspondent à la moitié du volume du milieu de culture) ; on y ajoute Q. S d'eau distillée pour 40 centimètres cubes environ et 3 centimètres cubes de NaOH à 10 p. 100, exempte de carbonates.

« On prépare en même temps un étalon colorimétrique correspondant à 0 gr. 00025 d'azote et contenant la même proportion d'acide trichloracétique et de soude que la solution à doser.

« On place ainsi dans un second vase jaugé de 60 centimètres cubes un volume d'acide trichloracétique à 20 p. 100 égal à la moitié du volume du filtrat trichloracétique employé pour le dosage, 25 centimètres cubes de solution étalon type de sulfate d'ammoniaque, Q. S. d'eau distillée pour 40 centimètres cubes environ et 3 centimètres cubes de NaOH à 10 p. 100.

Les deux solutions *extrêmement mélangées* sont

additionnées de 5 centimètres cubes de réactif de Nessler. On complète à 50 centimètres cubes avec de l'eau distillée, on mélange à nouveau et on procède immédiatement à la détermination colorimétrique au moyen du colorimètre de Duboscq ».

Il est facile, grâce aux dosages que nous venons d'indiquer, de se rendre compte de la transformation des albuminoïdes dans le milieu de culture que nous avons choisi; il suffit en effet, de faire des calculs simples en connaissant :

L'azote total donné par a.

L'azote protéique donné par a — c.

L'azote des protéoses donné par b — c.

L'azote non protéique donné par c.

L'azote de l'ammoniaque donné par d.

Tous nos chiffres ont été calculés en azote et en centigrammes par litre de bouillon de culture.

Les chiffres que nous avons obtenus varient avec les espèces microbiennes; il est probable même qu'ils pourraient varier légèrement avec les différentes souches, nous n'avons pu malheureusement faire ces recherches à cause de la dislocation de notre formation.

Quelle que soit l'espèce microbienne en cause, il est remarquable de voir que la courbe de production d'azote non protéique est régulièrement ascendante à mesure que vieillit la culture, et cette production peut aller jusqu'à la *transformation totale des albuminoïdes du milieu.*

Certaines espèces microbiennes sont très protéolyti-

ques et donnent rapidement une protéolyse totale; c'est le cas du sporogenes, du bifermentans, de l'anthracoïdes, du protéus et de l'histolyticus; d'autres ont leur action protéolytique renforcée du fait de leur association à une autre espèce microbienne : c'est le cas de l'association du sporogenes au perfringens qui donne une protéolyse totale dès le quatrième jour de la culture.

Cette association microbienne est malheureusement une des seules que nous ayions pu étudier. Il est probable que l'action protéolytique des bacilles habituels de la gangrène gazeuse peut être augmentée considérablement par les associations multiples des diverses

PRODUCTION D'AZOTE NON PROTÉIQUE.

ESPÈCES MICROBIENNES	TUBES TÉMOINS N total	TUBES TÉMOINS N non protéique	AGE DE LA CULTURE en jours. 1.	2.	4.	8.	16.	32.
B. sporogenes + B. perfringens	175	8	69.	137.	175.	protéolyse totale.		
B. sporogenes	187	8	18.	76.	108,	187.	protéolyse	totale.
B. bifermentans	190	8	14.	70.	130.	168.	190.	
B. proteus	190	8	10.	18.	73.	92.	156.	
B. anthracoïdes	170	8	19.	35.	49.	80.	120.	140.
B. histolyticus	190	8	11.	14.	19.	65.	100.	
B. perfringens	170	8	36,5.	51.	70.	88.	88.	88.
B. fallax	190	8	10.	11.	12.	21.	64.	82.
Vibrion septique	163	8	8.	10.	12.	12.	56.	80.
B. œdematiens	180	8	8.	12.	15,5.	15,5.	28.	43.
B. putrificus	190	8	12.	15.	18.	18.	18.	18.
Staphylocoque doré	175	8	8.	11.	11.	11.	11.	11.

espèces microbiennes que l'on retrouvait toujours dans les plaies de nos blessés.

Nous n'avons trouvé dans nos cultures qu'une très faible quantité de protéoses; ces corps sont en effet

transformés en azote non protéique à mesure de leur apparition. Par contre, la production d'ammoniaque est beaucoup plus abondante et semble bien être en rapport avec l'activité protéolytique des espèces microbiennes que nous avons étudiées.

1° ***Étude du sporogenes.*** — (Carb...). — Le sporogènes produit rapidement une protéolyse intense, et en peu de jours, elle est totale ; la production d'ammoniaque que nous avons également recherchée est plus tardive et moins intense.

La souche que nous avons choisie provenait d'une gangrène gazeuse mortelle et le sporogenes isolé a servi à M. Weinberg pour préparer son sérum anti-sporogenes.

Le tube témoin donnait au dosage :

Azote total	187
Azote non protéique.	8
Azote de l'ammoniaque.	0

Dès le premier jour de culture, soit 24 heures d'étuve à 37°, en tube scellé à la lampe, les dosages donnaient déjà des chiffres très élevés, on avait :

Azote non protéique.	18
Azote de l'ammoniaque.	4

Le deuxième jour, la production était plus intense encore :

Azote non protéique.	76
Azote de l'ammoniaque.	7

Le quatrième jour, on avait :

Azote non protéique	108
Azote de l'ammoniaque.	28

Le huitième jour, la transformation était totale, on avait :

Azote non protéique.	187
Azote de l'ammoniaque.	50

Dès lors, les dosages pratiqués en série pendant 16 jours montraient la constance de la production d'azote non protéique, et le chiffre obtenu en azote de l'ammoniaque ne variait plus.

Nos résultats concordent parfaitement avec les données de MM. Weinberg et Séguin (p. 114-115) qui indiquent l'action très fortement protéolytique de ce germe. Cependant leurs recherches sont seulement qualitatives, alors que par notre procédé de dosage, nous pouvons apprécier la protéolyse au point de vue quantitatif, et mesurer ainsi toute son étendue.

2° ***Étude du Bacille perfringens.*** — La souche étudiée provient d'une gangrène gazeuse de la cuisse droite dont l'observation est rapportée dans la thèse de J. Michaux (*Contribution à l'étude de la sérothérapie curative de la gangrène gazeuse*. Observ. 5, page 57). L'examen bactériologique avait montré du perfringens, du vibrion septique, du sporogenes.

Le dosage montrait pour le tube témoin :

Azote total	170
Azote non protéique	8
Azote de l'ammoniaque.	0

Après 24 heures d'étuve, on obtenait :

N. non protéique	36 5
N. ammoniaque	0

Après 48 heures d'étuve, on avait :

N. non protéique	51
N. ammoniaque	0

Après 4 jours d'étuve, on avait :

N. non protéique	70
N. ammoniaque	0

Après 8 jours, on obtenait :

N. non protéique	88
N. ammoniaque	0

A partir de ce jour jusqu'au 38e jour, les chiffres obtenus pour l'azote non protéique ne variaient plus ; par contre, le 32e jour, on obtenait 11 de N. ammoniaque.

Nos résultats nous permettent d'apprécier exactement les propriétés protéolytiques de notre souche; rappelons que jusqu'ici, l'action protéolytique du perfringens était très controversée ainsi que nous le trouvons indiqué dans la *Monographie* de MM. Weinberg et Séguin (p. 69-70) ; il ne semble pas, comme le pensent MM. Tissier et Martelly que l'action protéolytique de ce germe soit très intense ; par contre, l'opinion de P. Simonds paraît juste en ce sens que la production d'ammoniaque est très faible, et en tous cas très tardive puisque nous n'avons constaté sa présence qu'après 29 jours de culture.

La question des différences qui peuvent exister entre les souches reste entière puisque nous n'avons étudié qu'une seule souche.

Il est intéressant de rapprocher ces résultats de ceux obtenus par l'association sporogenes + perfringens.

Association sporogenes + perfringens. — Nous avons étudié des souches provenant du blessé qui déjà nous avait fourni notre perfringens seul.

Les résultats ont été rapides, et en quatre jours, la protéolyse était totale.

Le tube témoin donnait :

N. total	175
N. non protéique	8
N. ammoniaque	0

Après 24 heures d'étuve, on avait :

N. non protéique	69
N. ammoniaque	0

Après 48 heures d'étuve, on obtenait :

N. non protéique	137
N. ammoniaque	0

Après 3 jours, on avait :

N. non protéique	168
N. ammoniaque	0

Le 4e jour, la protéolyse était totale, on avait :

N. non protéique	175
N. ammoniaque	0

Le 8e jour seulement, on obtenait :

N. ammoniaque	50

Le 16e jour :

N. ammoniaque 60

Le 32e jour :

N. ammoniaque 64

Ainsi donc tandis que le sporogenes seul donnait une protéolyse totale après 8 jours de culture et le perfringens seul une protéolyse qui atteignait à peu près la moitié de l'azote total, dans le même espace de temps, les deux microbes réunis donnaient au 4e jour une protéolyse totale; il semble donc bien, que dans notre cas le pouvoir protéolytique de chaque espèce ait été augmenté du fait même de l'association ; il est donc possible de croire que les divergences d'opinion qui existent sur le pouvoir protéolytique du perfringens sont dues en grande partie aux difficultés que l'on a à isoler des souches absolument pures.

Étude du bifermentans. — La souche que nous avons étudiée provient du laboratoire de MM. Weinberg et Séguin. La protéolyse a été rapide et totale en 16 jours. Comme l'indiquent MM. Weinberg et Séguin, son action est en tous points « comparable à celle du sporogenes ; il digère comme lui la gélatine, la caséine, l'ovalbumine et le sérum coagulé; il donne de l'indol, de l'hydrogène sulfuré, des acides aminés et de l'ammoniaque ».

En effet, nos dosages donnent les résultats suivants :

N. total. 190
N. non protéique 8
N. ammoniaque 0

Après 24 heures d'étuve, on avait :

N. non protéique 14
N. ammoniaque 10

Après 48 heures de culture :

N. non protéique 70
N. ammoniaque 25

Après 3 jours :

N. non protéique 128
N. ammoniaque 40

Après 4 jours :

N. non protéique 130
N. ammoniaque 42

Après 5 jours :

N. non protéique 140
N. ammoniaque 57

Après 6 jours :

N. non protéique 140
N. ammoniaque 57

Après 9 jours :

N. non protéique 168
N. ammoniaque 62

Après 11 jours :

N. non protéique 180
N. ammoniaque 66

Après 14 jours :

N. non protéique	180
N. ammoniaque	66

Après 16 jours :

N. non protéique	190
N. ammoniaque	66

Dès le 8e jour, la protéolyse était presque complète, mais ne devenait totale que le 16e jour.

Comme pour le sporogenes, la formation d'ammoniaque était rapide puisque, après 24 heures de culture, N. ammoniaque = 10.

Parmi tous les germes que nous avons étudiés, c'est le bifermentans qui donne la plus grande quantité d'ammoniaque.

L'azote de l'ammoniaque atteint en effet 66.

Étude du protéus. — Nous avons étudié une souche associée à des staphylocoques qui provenaient de la plaie d'un de nos blessés, l'action protéolytique du staphylocoque étant à peu près nulle, il est probable que c'est le protéus qui est véritablement l'agent de la protéolyse intense que nous avons constatée.

Le tube témoin donnait :

N. total	190
N. non protéique	8
N. ammoniaque	0

Après 24 heures d'étuve en tube non scellé à la lampe, on avait :

N. non protéique. 10
N. ammoniaque 0

Après 48 heures d'étuve, on avait :

N. non protéique 18
N. ammoniaque 0

Après 4 jours d'étuve :

N. non protéique 73
N. ammoniaque 26

Après 8 jours d'étuve :

N. non protéique 92
N. ammoniaque 36

Après 11 jours d'étuve :

N. non protéique. 140
N. ammoniaque 36

Après 14 jours d'étuve :

N. non protéique 145
N. ammoniaque 36

Après 16 jours d'étuve :

N. non protéique. 156
N. ammoniaque. 36

Étude du B. anthracoïdes. — Bien que le pouvoir protéolytique de ce microbe ne soit pas toujours reconnu, nous avons été frappée de son intensité; la protéolyse est à la fois rapide et presque totale.

Nous avons étudié une souche qui provenait du laboratoire de MM. Weinberg et Séguin.

Le tube témoin donnait :

N. total	170
N. non protéique	8
N. ammoniaque	0

Après 24 heures d'étuve en tube non scellé, on avait :

N. non protéique	19
N. ammoniaque	0

Après 48 heures :

N. non protéique	35

Après 3 jours :

N. non protéique	41

Après 4 jours :

N. non protéique	49

Après 6 jours :

N. non protéique	57

Après 7 jours :

N. non protéique	68

Après 9 jours :

N. non protéique	80

Après 11 jours :

N. non protéique	83

Après 13 jours :

N. non protéique	88

Après 18 jours :

N. non protéique 120
N. ammoniaque 18

Après 25 jours :

N. non protéique 140

Étude du B. Histolyticus. — Nous avons étudié une souche provenant du laboratoire de MM. Weinberg et Séguin ; malheureusement tous nos tubes de culture n'ont pas poussé, et nous avons dû nous arrêter au 6e dosage ; la protéolyse était déjà intense, mais non totale.

Le tube témoin donnait :

N. total. 190
N. non protéique 8

Après 24 heures d'étuve à 37° en tube scellé, on avait :

N. non protéique 11

Après 48 heures :

N. non protéique. 14

Après 4 jours :

N. non protéique 19

Après 9 jours :

N. non protéique. 65

Après 11 jours :

N. non protéique 92

Après 14 jours :

N. non protéique 100

Étude du B. Fallax. — Ce bacille qui, pour MM. Weinberg et Séguin, ne liquéfie ni la gélatine, ni la caséine, ni l'ovalbumine, ni le sérum coagulé, a cependant un pouvoir protéolytique assez notable, et assez rapide.

Notre échantillon microbien provenait du laboratoire de MM. Weinberg et Séguin.

Le tube témoin donnait :

N. total	190
N. non protéique	8

Après 24 heures d'étuve à 37° en tube scellé, on avait :

N. non protéique	10

Après 48 heures :

N. non protéique	11

Après 4 jours :

N. non protéique	12

Après 9 jours :

N. non protéique	15

Après 11 jours :

N. non protéique	21

Après 16 jours :

N. non protéique	64

Après 21 jours :

N. non protéique	82

Étude du vibrion septique. — Le vibrion septique a un pouvoir protéolytique à peu près égal à celui du

B. Fallax; nous avons fait pour ce microbe des dosages sous le milieu à l'œuf et sur du plasma de cheval.

Nous avons obtenu :

Milieu à l'œuf, tube témoin :

N. total. 163
N. non protéique 8

Après 24 heures d'étuve à 37° en tube scellé :

N. non protéique 8

Après 48 heures d'étuve :

N. non protéique 10

Après 5 jours :

N. non protéique 12

Après 8 jours :

N. non protéique 12

Après 14 jours :

N. non protéique 38

Après 17 jours :

N. non protéique 56

Après 22 jours :

N. non protéique 74

Après 32 jours :

N. non protéique 80

Pour notre milieu au plasma de cheval, nous avons obtenu une protéolyse encore moins intense; nous

croyons d'ailleurs que le vibrion septique poussait mal en ce milieu.

Le tube témoin donnait :

N. total. 1162
N. non protéique 25

Après 36 heures d'étuve à 37°, on avait :

N. non protéique 30

Après 5 jours :

N. non protéique 33

Après 8 jours :

N. non protéique 33

Après 12 jours :

N. non protéique 40

Après 19 jours :

N. non protéique 40

Après 26 jours :

N. non protéique 42

Après 31 jours :

N. non protéique 62

Étude du B. œdematiens. — Ce bacille est très faiblement protéolytique; il est d'ailleurs extrêmement difficile à étudier dans des cultures en série, car il pousse très mal en repiquage, souvent même il ne pousse pas. Notre souche provenait d'une gangrène gazeuse soignée par M. le Dr Vaucher. Le tube témoin donnait :

N. total 180
N. non protéique 8

Après 24 heures d'étuve à 37° en tube scellé on avait :

N. non protéique 8

Après 48 heures :

N. non protéique 12

Après 5 jours :

N. non protéique 15

Après 8 jours :

N. non protéique 15

Après 14 jours :

N. non protéique 18

Après 18 jours :

N. non protéique 28

Après 20 jours :

N. non protéique 43
N. ammoniaque 9

Étude du B. putrificus. — Nos résultats nous ont quelque peu surprise ; en effet, MM. Weinberg et Séguin le considère comme un agent protéolytique puissant, alors que nous avons obtenu dans tous nos tubes une protéolyse à peine marquée, et cependant nos cultures avaient bien poussé. La souche étudiée venait du laboratoire de MM. Weinberg et Séguin.

Le tube témoin donnait :

N. total. 190
N. non protéique 8

Après 24 heures d'étuve à 37° en tube scellé, on avait :

N. non protéique 12

Après 48 heures :

N. non protéique 15

Après 4 jours :

N. non protéique 18

A partir de ce jour, la protéolyse n'augmentait plus et le 32e jour de culture, elle était encore de :

N. non protéique 18

Étude du staphylocoque doré. — Cet agent microbien est à peine protéolytique, quel que soit l'âge de la culture.

Nous avons trouvé :

Tube témoin :

N. total. 175
N. non protéique 8

Après 24 heures d'étuve à 37°, en tube non scellé :

N. non protéique 8

Après 48 heures :

N. non protéique 11

Nos dosages pratiqués jusqu'au 32e jour, nous donnèrent toujours le même résultat.

De tous nos agents microbiens, c'est donc le moins actif au point de vue protéolytique.

En se reportant au tableau que nous avons donné au début de ce chapitre, il est facile de voir que nous avons *pu classer* les microbes que nous avons étudiés *en mesurant exactement* leur action protéolytique.

CONCLUSIONS

1° Le dosage de l'azote non protéique par le procédé de *la nesslérisation* permet d'apprécier, de suivre et de doser d'une manière mathématique l'intensité de la protéolyse microbienne.

2° Dans nos cultures, la courbe de production de l'azote non protéique offre une marche régulièrement ascendante qui peut aller jusqu'à *la transformation totale* des albuminoïdes du milieu.

3° La production d'ammoniaque est minime et semble en rapport avec l'activité protéolytique globale des espèces étudiées.

4° Le dosage de l'azote non protéique permet de mesurer *l'activité protéolytique comparée* des différentes espèces microbiennes.

5° Parmi les divers agents microbiens dont nous avons étudié l'action protéolytique, *le sporogenes* est le plus actif; il donne *une protéolyse totale* en 8 jours.

6° Les *associations microbiennes* paraissent avoir une action protéolytique *plus grande* que chacun des microbes qui les constituent, comme c'est le cas des associations sporogenes + perfringens et protéus + staphylocoques.

Vu : le Président,
H. ROGER

Vu : le Doyen,
H. ROGER

Vu et permis d'imprimer :
Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris
L. POINCARÉ

BIBLIOGRAPHIE

Berthelot (A.). — Étude biochimique de deux microbes anaérobies du contenu intestinal (*Annales Inst. Pasteur*, 1909. Vol. XXIII, p. 85-90).

— Ptomaïnes et plaies de guerre (Note présentée par M. Roux). *C. R. de l'Acad. des Sciences.* T. CLXVI, n° 4. Janvier 1918, page 187.

Delbet (Pierre) et Fiessinger (Noël). — Biologie de la plaie de guerre (*Annales de la clinique chirurgicale*, 1918, page 103.

Fiessinger (Noël). — L'antiferment protéolytique (*Arch. mal. du cœur et du sang.* Août 1910).

— La réaction microchimique des oxydases dans les tissus humains (*Arch. méd. expér. et An. path.* T. XXIV, n° 5, Septembre 1912), en collaboration avec L. Roudowska.

— La défense leucocytaire dans les plaies de guerre (*Arch. de méd. expérimentale*, 1916. Vol. XXVII, p. 270-300).

— Contribution à l'étude des exsudats de la plaie de guerre. I. Les premières heures. II. La période de détersion (10e heure à 10e jour) (*C. R. Soc. Biol.*, 1916. Séance du 3 Juin) (en collaboration avec Montag).

— La biologie de la gangrène gazeuse (*Journal des Praticiens*, 1917, 12 Janvier p. 20; 20 Janvier, p. 38).

— Études sur le pouvoir protéolytique des leucocytes

polynucléaires du sang circulant (*Annales de Médecine*. T. IV, juillet-Août 1917)(en collaboration avec R. Clogne).

Folin (Otto) et W. Denis. — Nitrogen determinations by direct nesslerisation (*The Journal of biological Chemistry*, 1916, p. 472. T. XXVI).

Grigaut et Guérin. — Dosage de l'azote non protéique du sang par le réactif de Nessler (*Soc. Biol.* 7 Décembre 1918, p. 11-39).

— Procédé précis de dosage de l'urée dans de faibles quantités de sang (*Soc. Biol.* 11 Janvier 1919, page 25).

Grigaut, Guérin et Mme Pommay-Michaux. — Sur la mesure de la protéolyse microbienne. (*Soc Biologie.*, 25 Janvier 1919, p. 66).

Henry. (H.). — On some anaerobes found in wounds and their mode of action in the tissues. (*British medical Journal.*, 1917, 16 Juin, p. 806).

— An investigation of the cultural reactions of certain Anaerobes found in wounds. (*The Journal of Pathology and Bact.*, 1917, vol. XXI, p. 344).

Jobling (J. W.) and Petersen (W.). — The relation of bacteriolysis to proteolysis, studies ou ferments action. (*Journal of experimental medicine*, vol. XX, n° 4, 1914).

Metchnikoff. — Etude sur la flore intestinale. (*Ann. Inst. Pasteur*, 1908, vol. XXII, p. 929).

Policard (A.), Desplas (B.) et Phelip (A.). — Les phénomènes de protéolyse dans les plaies de guerre. (*Lyon chirurgical.* Juillet-Août 1916).

Policard (A.). — *L'évolution de la plaie de guerre. Mécanismes biologiques fondamentaux.* Masson, 1918.

Simonds. — Studies on Bacillus welchii with special reference to gas gangrene. (*Journal of experimental medicine*, 1917, vol. XXV, p. 821).

Tissier et Marteley. — Recherches sur la putréfaction de la viande de boucherie. *Ann. Inst. Pasteur*, 1902, Vol. XVI, p. 865).

Tissier. — Recherches sur la flore bactérienne des plaies de guerre. (*Ann. Inst. Pasteur*, 1916, p, 681 et 1917, p. 161).

Vaucher et Guérin. — Action du Bacillus sporogenes sur quelques hydrates de carbone et sur les matières protéiques des milieux de culture. (*Bull. Soc. Biologie*, 1918, p. 362).

Weinberg et Séguin. — *La gangrène gazeuse*. Masson, 1918.

Wolf (C. G. Lewis) and **Harris** (J. E. G). — Contribution to the Biochemistry of pathogenic anaerobes.

I. The Biochemistry of Bac. Welchii and Bac. sporogenes (Metchnikoff). *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 1917, vol. XXI p. 386).

IV. The Biochemistry of Bacillus histolyticus. (*The Journal of Pathol. and Bact.*, 1918, vol. XXII).

Wolf (C. G. Lewis) and **S. Veith Telfet**. — Contribution to the Biochemistry of pathogenic anaerobes.

II et III. The acid production of Bacillus Welchii. (B. perfringens) and bacillus sporogenes. (Metchnikoff). (*The Biochemical Journal*, Cambridge). (Décember 1917, vol. XI, p. 1917 et 213).